

UNTERSUCHUNGEN DER CELLULOSE ZERSETZUNG DURCH CHAETOMIUM-ARTEN

I.

von

E. NOVÁK

Mikrobiologischer Lehrstuhl der Eötvös Loránd Universität, Budapest

Eingegangen: 26. November 1969

Die Zellulose ist ein organischer Stoff, der in der Natur in äußerst ansehnlichen Mengen vorkommt. In ihrer Zersetzung spielen die Pilze des Genus *Chaetomium* aus der Gruppe der Ascomyceten eine hervorragende Rolle.

Organismen, die eine derart bedeutungsvolle biologische Eigenschaft besitzen, bieten selbstverständlich zahlreiche, verschiedene Forschungsmöglichkeiten. Infolge ihrer allgemein bekannten Fähigkeit die Cellulose zu zersetzen, sowie ihrer guten Kultivierbarkeit eignen sich die *Chaetomium*-Arten ganz besonders für solche Untersuchungen. Deshalb wurden sie dieser Versuchsreihe zugrunde gelegt.

Im Prozeß und im Mechanismus der Cellulosezersetzung, sowie in ihrer qualitativen und quantitativen Nachweisung gibt es noch immer offene Fragen. Die Untersuchungen werden noch komplizierter dadurch, daß die Zwischen- und Endprodukte der Cellulosezersetzung — je nach der Natur des daran beteiligten Organismus — voneinander abweichen können.

Laut Nord-Vitucci (1948) vollzieht sich die Cellulosezersetzung, ungeachtet des daran beteiligten Mikroorganismus, infolge der Ektoenzyme und gewissermaßen ungeklärter Einwirkungen. Somit entsteht durch eine Zersetzung in mehreren Etappen aus der nativen Cellulose mit regelmäßiger Myzellarstruktur eine lösliche Glukose mit kleinen Molekülen. Diese Annahme wurde zwar von Versuchen bereits bestätigt, bedeutet aber nicht mehr, als den ersten Schritt der Cellulolyse.

Aufgrund der einschlägigen Fachliteratur kann man die vom Charakter der durchführenden Organismen bestimmten Haupttypen der Cellulolyse heute bereits genau umgrenzen.

Weidenhagen (1952) gibt folgende Etappen der von Pilzen durchgeführten Cellulolyse an: Cellulose — Glukose — Äthanol — Essigsäure — Oxalsäure.

Aus dieser äußerst weitverzweigten Literatur möchte ich das Werk von Siu (1951) hervorheben. Verfasser berichtet über die mit verschiedenen Methoden untersuchte Intensität der Zersetzung von Cellulose durch verschiedene Mikroorganismen. So werden z. B. Untersuchungen beschrieben, die auf der Respiration

tionsintensität — genauer: auf dem Ausmaß der Sauerstoffabsorption bzw. der Kohlendioxydbefreiung — beruhen, sowie über die Ergebnisse der Mengennmessung der dem Nährboden beigemengten Cellulose und der Reißfestigkeitsbestimmung von cellulosehaltigen Substanzen (Fäden, Textilien) berichtet.

Die qualitative Nachweisung der Cellulolyse gehört eigentlich zu den einfacheren Aufgaben. Die als einzige Kohlenquelle funktionierende Cellulose (Filterpapier), die wir bei der Kultur der Organismen benützen, bezeugt a priori, daß die auf ihr kultivierten Organismen die zu ihrer Ernährung gebrauchte Kohle durch Abbau der Cellulose gewinnen.

Auf das Ausmaß des Celluloseabbaus kann man z. B. aus der Aktivität der Cellulase schließen, die mit zahlreichen physikalischen und chemischen Methoden gemessen wird.

In bezug auf die chemischen Methoden der Enzymaktivitätsmessung betonen einige Autoren, die Meßgenauigkeit wäre durch die störende Wirkung der in den chemischen Prozessen anwesenden sonstigen Chemikalien und Substanzen gefährdet.

Die Aktivitätsmessung der Cellulase mit viskosimetrischer Methode ist in mancher Hinsicht vorteilhaft, z. B. sie weist nur die Aktivität der Cellulase nach, wodurch die Ergebnisse durch die Wirkung anderer Enzyme nicht gestört werden. Außerdem sind die solcherart gewonnenen Meßergebnisse jederzeit leicht reproduzierbar (L y r 1959, 1960).

Die Fachliteratur berichtet über eine ganze Reihe viskosimetrischer Verfahren: B a s u - G h o s e (1960), L y r (1959, 1960, 1962), N o r d (1948), R e e s e (1952), u. a.

Die Versuche zur Feststellung der Enzymaktivität wurden von diesen Autoren jeweils unter anderen Temperatur-, pH- und Inkubationsverhältnissen angesetzt: (S. Tab. I.)

Tabelle I.

	Inkubationszeit	Temperatur	pH
Reese	1 Stunde	50° C	5,4
Basu-Ghose	18 Stunden	40° C	5,0
Nord	15 Minuten	40° C	3,2
Lyr	10 Minuten	25° C	5,0

Unter den bisher bekannten viskosimetrischen Meßverfahren ist zweifelsohne jenes von L y r (1962) am einfachsten und leichtesten durchzuführen und fand auch in der vorliegenden Arbeit Anwendung.

Meine Versuche wurden mit den nachstehenden sechs *Chaetomium*-Arten durchgeführt:

1. *Chaetomium funiculum* C o o k e
2. *Chaetomium ochraceum* T s c h u d y
3. *Chaetomium indicum* C o r d a
4. *Chaetomium murorum* C o r d a
5. *Chaetomium elatum* K u n z e - S c h m i d t
6. *Chaetomium cancroideum* T s c h u d y

Die Stämme kamen größtenteils aus der Sammlung S ö r g e l (Quedlinburg), und waren zum Teil eigene Kulturen.

Die *Chaetomium*-Kulturen wurden zuerst auf cellulosehaltiges Medium von je 25 ml geimpft (0,1% Pepton, 0,1% K_2HPO_4 , 0,1% KH_2PO_4 , 0,05% $MgSO_4$, 0,1% Malzextrakt, 0,25% Cellulose in Form von homogenisiertem Filtrierpapier). Der pH-Wert wurde zu Beginn einheitlich auf 5,0 eingestellt, die Inkubation erfolgte bei 28° C. Während des Kultivierens konnte eine gewisse Verschiebung der pH-Werte beobachtet werden.

Die viskosimetrischen Messungen wurden gleichlaufend mit den übrigen Untersuchungen am 3., 7., 10., 14. und 17. Tag des Kultivierens durchgeführt.

Bei den Auswertungen wurde der Inhalt von je 5 parallelen Kolben filtriert. Das Pilzmyzel wurde von der enzymhaltigen Kulturflüssigkeit durch Filtration getrennt, sodann wurden das Trockengewicht des Myzels, die pH-Werte und die Viskositätsänderungen gemessen.

Für die Viskositätsmessungen wurde die 0,9%ige CMC-Lösung (mit dest. Wasser) (Cellufix FF 20. T248. Svenska Cellulosa A/B, Sundsvall-Sviden) im Wasserbad auf 45° C aufgewärmt und sodann mit mittelmäßiger Geschwindigkeit zentrifugiert. 18 ml dieser Celluloselösung wurde mit 2 ml-Enzymlösung der zu untersuchenden Pilzart vermischt.

Vorschriftsgemäß wurde die Viskosität des Gemisches nach einer 10 Minuten langen Inkubation bei 25° C gemessen. Die Messung erfolgte mit dem Rheo-Viskosimeter nach H ö p p l e r: 0,01 Küvette, 20 g Gewichtbelastung, 30 mm Senkung.

Bei den Kontrolluntersuchungen wurde anstatt 2 ml-Enzymlösung dieselbe Menge destillierten Wassers der Meßlösung beigegeben. Der Zusammenhang zwischen den Kontroll- und den Enzymlösungen wurde in % ausgedrückt. Nach Abzug dieses Wertes aus 100 ergab sich der Prozentsatz der Viskositätsabnahme. Dieser letztere Wert wurde dann in die Enzymeinheitstabelle von L y r (1956-62) eingesetzt. Diese Tabelle beruht auf der Annahme, daß 100 Enzymeinheiten mit jener Tätigkeit gleich seien, die die anfängliche Viskosität um 50% herabsetzt.

Aufgrund dieser Prinzipien wurden die sich aus der Cellulase-Aktivität der sechs *Chaetomium*-Arten ergebenden Enzymeinheiten ermittelt, und aus diesen auf das Ausmaß des Cellulose-Abbaus der Pilze geschlossen.

Die Kurven der Cellulase-Einheiten sind auf Abb. 1 zu sehen, denen klar zu entnehmen ist, daß die Cellulase bei allen sechs Arten in der ersten Woche eine äußerst geringe Aktivität aufweist. Die maximale Aktivität erfolgt am 14. bzw. 17. Tag der Inkubation, d. h. die Cellulase-Aktivität ist in der letzten Wachstumsphase des Vegetationskörpers am stärksten.

Nach absoluten Werten war die Cellulase-Aktivität bei *C. indicum* Corda am stärksten. Zumindest unter den gegebenen Kulturbedingungen erwies sich diese Art als der intensivste Cellulosezersetzer. Hinsichtlich der Intensität folgen ihr *Ch. funicolum* Cooke und *Ch. cancroideum* Tshudy.

L y r - N o v á k (1962) untersuchten mit ähnlicher Methode die Methode die Enzymaktivität von verschiedenen mikroskopischen Pilzen. Bei gewissen *Aspergillus*-, *Penicillium*- und *Myrothecium*-Arten erreichte die Cellulase-Aktivität ihren Höhepunkt, ähnlich wie bei den Chaetomien, in der zweiten

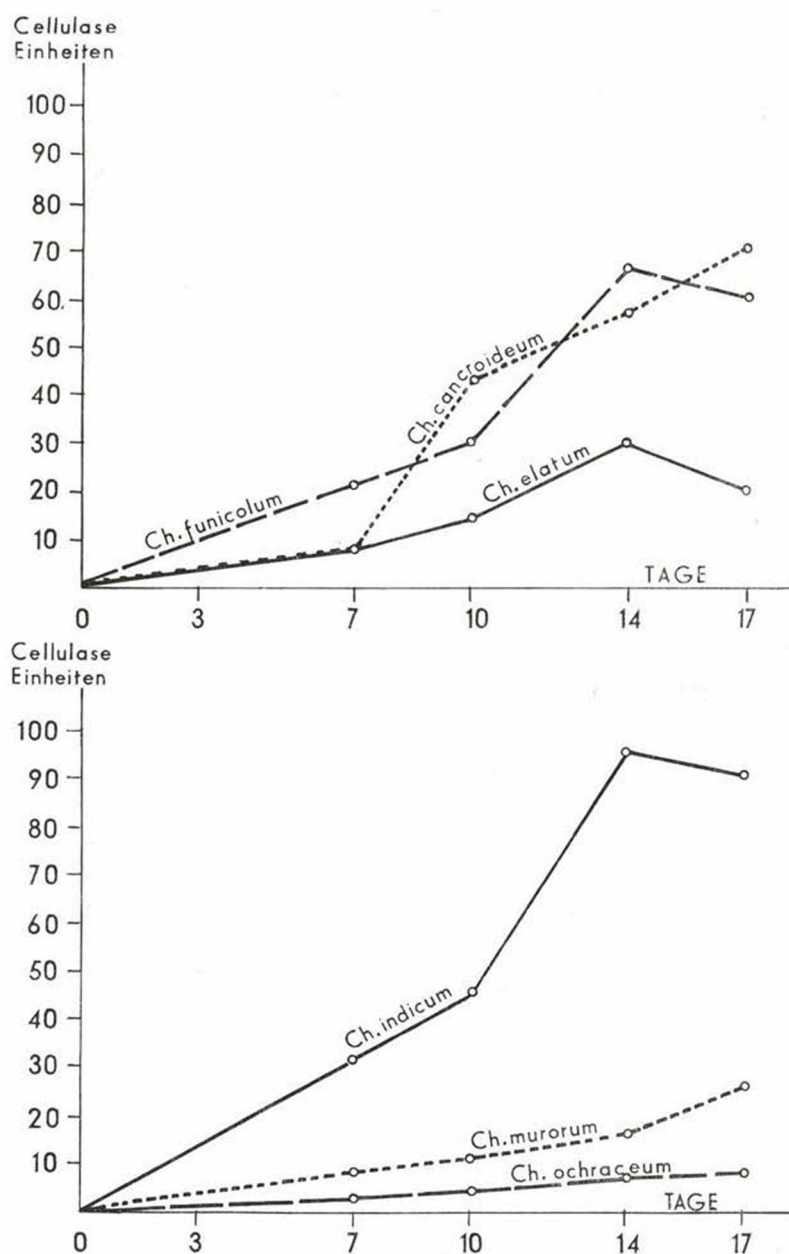


Abb. 1.

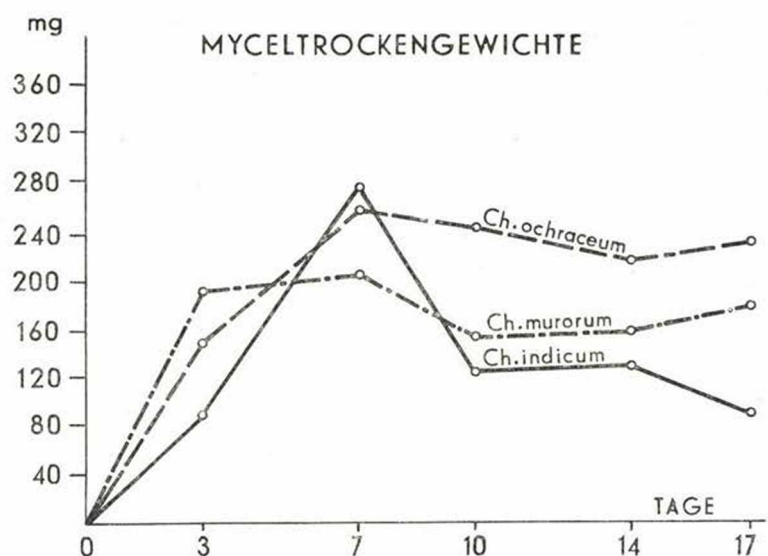
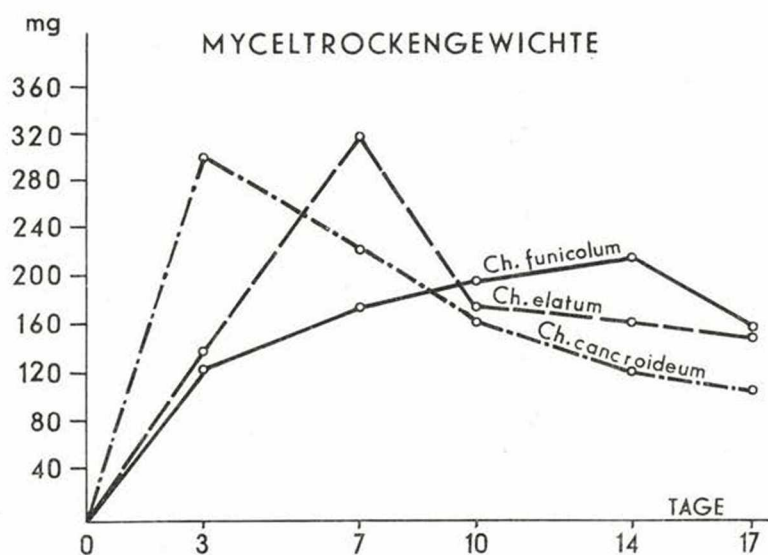


Abb. 2.

Woche. Sie stellten fest, daß die Cellulase-Einheiten bei den untersuchten Pilzarten 100 oder noch niedrigere Werte repräsentieren. Auch die Werte der Enzymeinheiten der Chaetomien bewegen sich in dieser Höhe.

Diese Tatsache schließt jedoch meines Erachtens nicht die Möglichkeit aus, durch Änderung gewisser Kulturbedingungen eine stärkere Enzymaktivität der Chaetomien zu induzieren. Ich gedenke dies in einer folgenden Versuchsreihe nachzuweisen.

Während der 17 Tage des Kultivierens konnten in der Myzelproduktion aufgrund der Trockensubstanzmessungen folgende Beobachtungen gemacht werden: In der Anfangsphase, am 3. – 7. Tag, konnte das stärkste Wachstum beobachtet werden. Diese plötzliche Entwicklung ist größtenteils die Folge der anwesenden Reservenährstoffe, während sich die später auftretende Gewichtsverringerung mit der Autolyse erklären läßt (Abb. 2.).

Zusammenfassend kann man feststellen, daß die *Chaetomium*-Arten hinsichtlich der Enzymaktivität und der Trockensubstanzproduktion unter den angeführten Bedingungen sich ebenso verhalten, wie andere cellulolytische Mikropilze. Infolge ihrer weniger empfindlichen Natur, guten Kultivierbarkeit und bekannten cellulolytischen Eigenschaft eignen sich jedoch diese Organismen für Untersuchungen über die Produktion und die Funktion der Cellulase.

SCHRIFTTUM

- Basu, S. N. – Whitaker, D. R. 1953. Inhibition and stimulation of the cellulase of *Myrothecium verrucaria*. Arch. Biochem. Biophys. **42**: 12 – 24.
- Basu, S. N. – Ghose, S. N. 1960. The production of cellulase by fungi on mixed cellulose substrates. Can. J. Microbiol. **6**: 265 – 282.
- Bose, S. R. 1939. Enzymes of wood-rotting fungi. Ergebn. Enzymforschung **8**: 267 – 276.
- Lyr, H. 1956. Untersuchungen über die Peroxidasen höherer Pilze. Planta **48**: 408 – 413.
- Lyr, H. 1959. Die Bildung von Ektoenzymen durch holzerstörende und holzbewohnende Pilze auf verschiedenen Nährböden. II. Cellulose als C-Quelle. Arch. für Mikrobiologie **34**: 189 – 203.
- Lyr, H. 1960. Die Bildung von Ektoenzymen durch holzerstörende und holzbewohnende Pilze auf verschiedenen Nährböden. V. Arch. für Mikrobiologie. **35**: 258 – 278.
- Lyr, H. Novák, E. 1962. Vergleichende Untersuchungen über die Bildung von Cellulasen und Hemicellulasen bei einigen Pilzen. Zeitschr. für Allgem. Mikrobiologie, **2**: 86 – 98.
- Mandels, M. – Reese, E. T. 1960. Induction of Cellulase in Fungi by Cellobiose. Journ. of Bacteriology **79**: 816 – 820.
- Nord, F. F. – Vitucci, J. C. 1948. Certain Aspects of the Microbiological Degradation of Cellulose. Advances in Enzymology **8**: 253 – 298.
- Norkrans, B. 1963. Degradation of cellulose. Ann. Rev. Phytopathol. **1**: 325 – 350.
- Norkrans, B. – Wahlstrom, L. 1961. Studies on the inhibition of cellulolytic enzymes. Physiol. Plantarum, **14**: 851 – 860.
- Normann, A. G. 1937. The Biochemistry of Cellulose, the Polyuronides, Lignin, etc. Oxford Univ. Press. London.
- Normann, A. G. – Fuller, W. H. 1942. Cellulose Decomposition by Microorganisms. Advances in Enzymology **2**: 239 – 264.
- Pal, P. N. – Basu, S. N. 1961. A study of the properties of some fungal cellulases with particular reference to their inhibition. J. Sci. Ind. Res. (India), **12**: 336 – 338.
- Pettersson, G. – Cowling, E. B. – Porath, J. 1963. Studies on cellulolytic enzymes. I. Isolation of a low molecular weight cellulase from *Polyporus versicolor*. Biochem. Biophys. Acta **67**: 1 – 8.

- Petterson, G. — Porath, J. 1963. Studies on cellulolytic enzymes. II. Multiplicity of the cellulolytic enzymes of *Polyporus versicolor*. *Biochem. Biophys. Acta* **67**: 9 — 15.
- Reese, E. T. — Levinson, N. S. 1952. A comparative Study of the Breakdown of Cellulose by Microorganisms. *Physiol. Plantarum*, **5**: 346 — 366.
- Reese, E. T. — Siu, R. G. H. — Levinson, H. S. 1950. The biological degradation of soluble cellulose derivatives and its relationship to the mechanism of cellulose hydrolysis. *J. Bacteriol.* **59**: 485 — 497.
- Siu, R. G. H. 1951. *Microbial Decomposition of Cellulose*. Book Division Reinhold Publishing Corporation New-York.
- Siu, R. G. H. — Reese, E. T. 1953. Decomposition of Cellulose by Microorganisms. *The Botanical Review*, **XIX**, 7, 377 — 416.
- Thomas, R. 1956. Fungal cellulases VII. *Austral. J. Biol. Sci.* **9**: 159 — 183.
- Weidenhagen, R. 1950. *Ergebnisse der Enzymforschung*. Akademische Verlagsgesellschaft Geest-Porting K. G. Leipzig.